



TITLE:

Structural and functional analysis of a sporulation protein Spo0M from *Bacillus subtilis*( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Sonoda, Yo

---

CITATION:

Sonoda, Yo. Structural and functional analysis of a sporulation protein Spo0M from *Bacillus subtilis*. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19761>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-03-01に公開

( 続紙 1 )

|   |  |    |      |
|---|--|----|------|
| 京都大学  | 博士（農学）   | 氏名 | 園田 陽 |
| 論文題目  | Structural and functional analysis of a sporulation protein Spo0M from <i>Bacillus subtilis</i><br>(枯草菌芽胞形成制御因子Spo0Mタンパク質の構造と機能に関する研究) |    |      |
| (論文内容の要旨)   |  |    |      |
| <p>外部環境の変化に対する応答はすべての生物にとって生存に必須の機能であり、様々な応答機構が知られている。枯草菌は栄養分の枯渇を感知し芽胞を形成する。Spo0Mは芽胞形成制御因子の1つであり、芽胞形成初期に発現が誘導される。<i>spo0M</i>遺伝子破壊株或いは強制発現株では芽胞形成に異常をきたすことが報告されており、またSpo0Mはカタボライト制御因子であるCcpA (catabolite control protein A)と複合体を形成する可能性が報告されている。さらに、そのアミノ酸配列より、Spo0Mは哺乳類の細胞内シグナル伝達に参与するタンパク質であるアレクチンと部分的な相同性があることが報告されている。しかしながら、現在までSpo0Mの詳細な機能や構造に関する報告は無い。本研究は、表面プラズモン共鳴法（SPR法）による生体高分子間の相互作用解析及びX線結晶構造解析を行って、Spo0Mの機能と構造を明らかにしたものであり、その内容は以下のように要約される。</p>  |  |    |      |
| <p>1. 枯草菌芽胞形成制御因子Spo0Mの機能解析</p> <p>枯草菌のゲノムDNAに存在する<i>spo0M</i>遺伝子をクローニングし、Spo0Mタンパク質を大腸菌で大量発現した後に、その単離と精製を行った。同様にCcpAタンパク質とCcpAのエフェクタータンパク質であるHPr-Ser-P（Ser46がリン酸化されたhistidine-containing phosphotransfer protein）を精製した。CcpAとHPr-Ser-Pの複合体形成に関してSPR解析を行った結果、その複合体の解離定数（<math>K_d</math>）は9.4 <math>\mu\text{M}</math>であり既報と同程度の値であった。次に、Spo0MとCcpAの相互作用を同様に解析した結果、Spo0M/CcpA複合体の<math>K_d</math>は54 <math>\mu\text{M}</math>であった。また、HPr-Ser-P存在下ではSpo0M/CcpA/HPr-Ser-P複合体からCcpA/HPr-Ser-Pへの<math>K_d</math>は14 <math>\mu\text{M}</math>であった。これらの結果から、Spo0MはCcpAに直接結合し、その結合親和性はHPr-Ser-Pの存在下において上昇することがわかった。次に、xylose isomeraseをコードする<i>xylA</i>遺伝子の<i>cre</i> (catabolite responsive element) 配列を含む二本鎖DNAとCcpAとの結合について検討した。二本鎖DNAの末端をビオチン標識し、センサーチップ上に固相化したストレプトアビジンと結合させた。SPR法によって検討した結果、CcpA/HPr-Ser-P複合体は二本鎖DNAと結合し、CcpA/HPr-Ser-P/DNA複合体の<math>K_d</math>は0.94 <math>\mu\text{M}</math>であった。一方、Spo0Mは濃度依存的にCcpA/HPr-Ser-PのDNA結合を阻害し、その阻害定数（<math>K_i</math>）は45 <math>\mu\text{M}</math>と算出された。これらの結果より、Spo0MはCcpA/HPr-Ser-Pに直接結合することにより、CcpA/HPr-Ser-PとDNAとの結合を阻害し、CcpAによるカタボライト抑制下にあった芽胞形成関連遺伝子群の発現誘導に参与していることが示唆された。</p> |  |    |      |
| <p>2. Spo0Mの結晶構造解析</p> <p>Spo0Mの三次元構造を明らかにするため、最初に全長のSpo0Mタンパク質（Spo0M<sup>FL</sup>）の結晶化を試み、得られた結晶より3.2 Å分解能のX線回折データを得たが、構造の決定には至らなかった。結晶の質が精製バッチごとに変化することなどから、良質の結晶を調製するためにはSpo0Mタンパク質の安定性を改善する必要があることが推定された。そこで、示差走査蛍光定量法（DSF法）を用いて熱安定変異体をスクリーニングした結果、N末端より10残基のアミノ酸を欠失させた変異体（Spo0M<sup>11-258</sup>）が、Spo0M<sup>FL</sup>よりも変性温度が約8.5℃上昇することを見出した。</p>   |  |    |      |

Spo0M<sup>11-258</sup>の結晶化のスクリーニングを行った結果、Spo0M<sup>FL</sup>とは異なる条件で斜方晶の結晶が得られ、この結晶のPt置換体によるSAD (single wavelength anomalous diffraction) 法によって位相を決定して、モデリングを行い、最終的に2.3 Å分解能でR因子が23 %まで構造の精密化を行った。Spo0M<sup>11-258</sup>はN末側とC末側に二つのドメインを有し、Nドメインは7本のβ-ストランドで構成されるβ-サンドウィッチ構造を持つ。構造類似性の検索を行った結果、Nドメインはアレスチンの中でもαアレスチンに分類されるメンバーとr.m.s.d (root-mean-square deviation)が2.0 Åレベルでの構造類似性を示した。一方、Cドメインは5本のβ-ストランドで構成されるβ-バレルとそれを取り囲む4本のα-ヘリックスから成る。構造類似性の検索を行った結果、Cドメインは驚いたことに、哺乳類の免疫系に関与するPI31タンパク質のFPドメインとr.m.s.dが2.1 Åレベルでの構造類似性を有することがわかった。FPドメインはタンパク質間相互作用を介したホモダイマーやヘテロダイマー形成に関与すると考えられているドメインであり、現在までに哺乳類PI31タンパク質とFbxo7タンパク質の2種類でのみ存在が報告されている。このことから、Spo0MのCドメインがタンパク質間相互作用に関連した機能を有することが示唆された。以上の結果より、枯草菌のSpo0Mが哺乳類のアレスチン及びFPドメインと類似した機能と共通の祖先を有していることが示唆された。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

**Spo0M**は枯草菌の芽胞形成初期に重要な機能を果たすことが報告されており、そのアミノ酸配列から哺乳類のアレスチンファミリーに属することが示唆されているタンパク質であるが、その機能や構造についての具体的な報告は無かった。本論文は、タンパク質間およびタンパク質とDNAの相互作用解析を用いて**Spo0M**の機能を解明し、さらに、**Spo0M**のX線結晶構造解析を行って、その全体構造と各ドメインの特徴を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下の2点である。

1. 機能未知であった枯草菌芽胞形成制御因子**Spo0M**が、**CcpA/HPr-Ser-P**と直接結合することを明らかにした。さらに、この複合体を形成することによって**CcpA/HPr-Ser-P**のDNAの*cre*配列への結合を阻害することを明らかにした。これらの結果から、**Spo0M**は**CcpA**によるカタボライト抑制を解除することにより**CcpA**制御下の芽胞形成関連遺伝子群の発現を誘導するという作業仮説を提唱した。
2. X線結晶構造解析により、**Spo0M**の構造を2.3 Å分解能で精密化し、2個のドメインから成る全体構造を明らかにした。立体構造データベースとの比較により**Spo0M**のNドメインは哺乳類のアレスチンと、CドメインはFPドメインと類似した構造を有していることを明らかにした。すなわち、枯草菌の**Spo0M**の各ドメインは、それぞれの哺乳類タンパク質と共通の祖先を有し、類似した機能を有していることが示唆された。いずれの哺乳類タンパク質も、現在までにバクテリアホモログの構造に関する報告は無かったことから、本研究で初めてその存在が明らかとなった。

以上のように、本論文は芽胞形成制御因子**Spo0M**の機能を生体高分子間の相互作用解析によって解明し、さらに、今まで未知であった**Spo0M**の結晶構造を明らかにして、哺乳類のアレスチン及びFPドメインのホモログがバクテリアに存在することを構造生物学的に証明した最初の報告であることから、微生物学、生化学、分子進化学、構造生物学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）